

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DAS KATALASEVERHALTEN
BEI PATHOGENEN COLIBAKTERIEN

Klaus Hilfer

2

1964





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DAS KATALASEVERHALTEN
BEI PATHOGENEN COLIBAKTERIEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Hilfer
aus Essen

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privat-Dozent Dr. W. LANG
Mitberichterstatter:	Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Professor Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 12.5.1964

GEWIDMET MEINEN ELTERN,
DIE MIR DAS STUDIUM ERMÖGLICHTEN

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A.	<u>Katalase im Bakterienreich:</u>	7
	Vorkommen	7
	Chemische Analyse	8
	Bedeutung und Reaktionsmechanismus	8
	Nachweismethoden	11
	Thermische Einflüsse auf die Wirksamkeit	12
B.	<u>Katalase speziell beim Bacterium coli:</u>	14
	Eigenschaften und Bedeutung des Bacterium coli	14
	Bisherige Ergebnisse der Katalaseforschung	15
	Eigene Untersuchungen pathogener Colistämme	16
	a) pathogene Bedeutung der Untersuchungsstämme	16
	b) Beschreibung der Methodik	18
	c) graphische Darstellung des Katalaseverhaltens einiger Colistämme	22
	d) tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	34
C.	<u>Untersuchungsergebnisse und Diskussion</u>	42
D.	<u>Zusammenfassung</u>	45
E.	<u>Literaturverzeichnis</u>	46

A. KATALASE IM BAKTERIENREICH

VORKOMMEN

Im Jahre 1901 isolierte LOEW aus Tabakblättern ein gegen Wasserstoffsuperoxyd wirksames System, dem er den Namen "Katalase" gab. Dies bestätigte in der wissenschaftlichen Diskussion, wie sie seit THENARD's erstem Hinweis auf H_2O_2 -zersetzende Substanzen bestand, JACOBSON, der die Verantwortlichkeit für diese Fähigkeit einem besonderen Ferment zugeschrieben wissen wollte, während SCHÖNBEIN sie den meisten Fermenten vegetabilischer und animaler Gewebe zusprach.

Die jetzt von verschiedenen Seiten einsetzende Suche nach der Katalase ergab, daß es sich um eines der weitverbreitetsten und aktivsten Fermente der Natur überhaupt handelte, welches immer dort anzutreffen war, wo die Zelle ihr Leben über die Sauerstoffatmung aufrechterhielt.

Das katalatische Verhalten von Mikroorganismen in Gegenwart von H_2O_2 wies 1893 erstmals GOTTSTEIN nach. BEIJERINCK stellte diese Fähigkeit für Milchsäurebildner bald in Abrede, LOEWENSTEIN konnte sie den Diphtherieerregern und den Staphylokokken zuerkennen, für die Tetanusbakterien verneinen. ORLA-JENSEN bestätigten für die Milchsäurebakterien das Untersuchungsergebnis BEIJERINCK's, beim *Proteus vulgaris* ermittelten sie die größte Katalasequantität aller untersuchten Bakterienarten. FUJITA und KODAMA fanden *Shigella dysenteriae* katalasefrei, während HERBERT und PINSENT den *Micrococcus lysodeiolicus* als äußerst fermentstark erkannten.

Die Untersuchungen über die Bakterienkatalase lieferten also Ergebnisse differierender Art, die erstmals von KLUYVER und später von WIELAND durch den unterschiedlichen Ernährungsmechanismus der einzelnen Bakterienarten erklärt wurden. Danach entbehren alle sich rein fermentativ ernährenden Bakterien der Katalase, während solche, die den freien Sauerstoff zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels benötigen, dieses Enzym besitzen. Aber auch zu dieser Aussage fanden sich bald Ausnahmen.

So fand VIRTANEN die aeroben Essigsäure-, *Pseudomonas*- und Zellulosebakterien bedeutend katalaseärmer, als die anaeroben Propionsäurebildner. Nämlicher fand bei fakultativen Anaerobiern unter aeroben Bedingungen keine höhere Fermentaktivität, als unter anaeroben. THEORELL sah als Abweichung den katalasefreien Aerobier *Acetobacterium peroxydans* und den fermenthaltigen Anaerobier *Actinomyces necrophorus*. BINGOLD und LANG wiesen 1955 Pneumokokken und Arten von α -hämolyisierenden Streptokokken als katalasefrei nach.

Aus all diesen Untersuchungen ergibt sich für die Katalase des Bakterienreiches ein durch seine Wechselhaftigkeit beeindruckendes Bild.

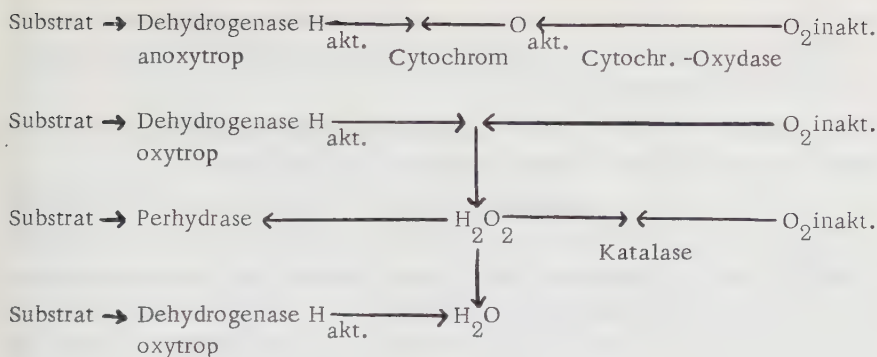
Wegen der minimalen Katalasekonzentrationen in den Zellen blieb der Einblick in die chemische Struktur lange Zeit verwehrt. Nachdem schon KUHN und VON EULER auf die katalatische Tätigkeit anderer Hämine hingewiesen hatten, gelang es ZEILE und HELLSTRÖM im Rahmen der Konstitutionsaufklärungsarbeiten der auf einen Hämanteil verdächtigen Enzyme auch bei der Katalase die Häminnatur nachzuweisen. Die Katalase konnte jetzt in die Reihe der Chromoproteide eingeordnet werden, deren Coenzym an Hand von spektrometrischen Untersuchungen mit Fermentpräparaten aus Pferdeleber, Kürbiskeimen, Hefe und Bakterien wie für das Bluthämin als Protohämin IX festgelegt wurde. Das Fermenteisen liegt hierbei in der dreiwertigen Form vor. Nur unter besonderen Versuchsbedingungen konnten ZEILE, FAWAZ und ELLIS neben anderen die 2-wertige Stufe ermitteln.

Als Apoferment dient ein vielleicht dem Globin ähnliches Protein, dessen genaue Aminosäurezusammensetzung noch nicht geklärt ist. BONNICHSEN und SCHNÜCHEL haben über die Struktur des kolloidalen Trägers der Pferdeblut-, Pferdeleber- und Rinderleberkatalase erste Angaben gemacht. Während SCHNÜCHEL aus der Rinderleberkatalase sechzehn verschiedene Aminosäuren analysieren konnte, wies BONNICHSEN in Pferdeleber- und Pferdeblutkatalase ~ unterschiedliche Säuren nach. Der Aufbau des Apoferments der Blut- und Leberkatalase des Pferdes unterschied sich nur bezüglich der Quantität der einzelnen Aminosäuren. In allen dreien war die Asparaginsäure prozentual am stärksten vertreten. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde von AGNER, SUMNER und CECIL aus Katalasepräparaten verschiedener Herkunft durch Ermittlung der nur geringfügig differierenden Sedimentationskonstanten ($11,0 - 11,3 \cdot 10^{-13}$) auf etwa 240 000 festgelegt, woraus sich ein Zusammentreffen von vier Hämgruppen in einem Enzymmolekül ergab.

BEDEUTUNG UND REAKTIONSMECHANISMUS

Der Entdecker LOEW schrieb der Katalase eine entgiftende Funktion zu. Die ursprünglich auf die reine Chemie beschränkte, von WIELAND entwickelte Oxydationstheorie erbrachte nach dem Beweis ihrer Verwendungsmöglichkeit in der Biochemie durch THUNBERG einen präziseren Einblick in die Katalasebedeutung.

Die WIELAND'sche Dehydrierungstheorie weist der Katalase die Rolle der Zerlegung des als Zwischenprodukt im intermediären Stoffwechsel entstandenen H_2O_2 zu. Die graphische Darstellung der Oxydationstheorie nach DIXON veranschaulicht diese H_2O_2 -Bildung und Katalasewirkung.



DIXON unterschied im Rahmen der Dehydrierungstheorie zwei verschiedene Dehydrogenasen. Eine, die er als oxytrop bezeichnet, besitzt die Fähigkeit, den Wasserstoff dergestalt zu aktivieren, daß er unter Verzicht auf die Mitwirkung von Cytochrom und Cytochromoxydase mit O₂ (molekular) reagieren kann, wobei H₂O₂ gebildet wird.

Die Aufgabe der Katalase ist es, das entstandene Peroxyd in Abhängigkeit von der Konzentration entweder im Sinne eines Peroxydasesystems mit bestimmten oxydierbaren Substraten der Zelle zur Reaktion zu bringen, oder bei einer, ein bestimmtes Minimum übersteigenden und dann als Gift wirkenden Konzentration, speziell katalatisch in H₂O und O₂ zu zerlegen.

THEORELL glaubt die Katalase in vivo ihrer spezifischen Reaktionsweise beraubt, da eine, die Unschädlichkeitsschwelle übersteigende H₂O₂-Konzentration nur selten erreicht werde.

THUNBERG schreibt der Katalase eine Bedeutung bei der besseren Ausnutzung des aufgenommenen O₂ zu. Er sieht bei der Oxydation eines Moleküls H₂ in H₂O₂ die wasserstoffaufnehmende Fähigkeit des O₂ nur zur Hälfte ausgenutzt. Sobald das H₂O₂ in H₂O und O₂ gespalten wird, verdoppelt sich die Wirksamkeit des O₂ als Wasserstoffakzeptor. Die "zyklische Oxydation" nach KEILIN und HARTREE weist der Katalase eine Rolle bei der biologischen Oxydation des in statu nascendi befindlichen H₂O₂ zu.

Über eine spezifische Bedeutung der Katalase bei Bakterien ist nichts bekannt. Im Vordergrund steht auch hier die Entgiftungsfunktion, die zur Lebensfähigkeit vieler Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen unbedingt erforderlich ist. LANG erwähnt in diesem Zusammenhang das Bacterium coli, bei dem beobachtet wurde, daß eine Erhitzung auf 80°C ein Wachstum der Keime nur noch unter anaeroben Verhältnissen ermöglichte. LANG vermutet hinter dieser Erscheinung die isolierte Ausschaltung der Katalase.

Über den Reaktionsmechanismus der Katalaseeinwirkung auf H_2O_2 sind zahlreiche Hypothesen aufgestellt worden. Eine alle Einzelheiten umfassende Klärung steht jedoch bis heute noch aus.

WIELAND sprach 1921 im Zusammenhang mit der Dehydrierungstheorie der Katalase die H_2O_2 -zerlegende Wirkung nach folgender Gleichung zu:



Die Reaktion soll in 2 Phasen verlaufen, wobei die erste, als bedeutend langsamere, die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.



Eine Reaktionsgleichung, bei der aus einem Molekül H_2O_2 Wasser und atomarer Sauerstoff entsteht, wies WIELAND zurück.

Die Radikaltheorie nach HABER und WILLSTÄTTER beschreibt die Katalase als eine H_2O_2 -spezifische Dehydrase, deren Wirkung in einer Kettenreaktion mit den auftretenden Radikalen $-\text{O} \cdot \text{OH}$ und $-\text{OH}$ besteht.

Reaktionsgleichungsbild:

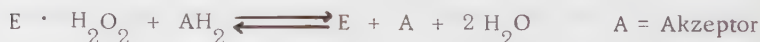


KEILIN und HARTREE erklärten den Reaktionsverlauf aus dem Charakter des Enzyms als Ferriverbindung. Nach ihnen liegt ein Übergang der Ferri- in die Ferro- und eine Zurückbildung in die Ferriform vor.

THEORELL und CHANCE verneinten für die Katalase- und Peroxydasereaktion einen Übergang des 3-wertigen Eisens in die 2-wertige Stufe. Sie sehen in der Katalasewirkung eine Abwandlung der Oxydasereaktion derart, daß ein zweites Molekül H_2O_2 als Akzeptor des Enzym- H_2O_2 -Komplexes dient.

Reaktionsformeln:

1) Peroxydasereaktion:



2) Katalasereaktion:



Das H_2O_2 soll an das Fe (III) hierbei gebunden sein.

THEORELL erklärt die spezifische Katalasewirkung gebunden an ein Abhängigkeitsverhältnis der H_2O_2 -Konzentration zum Gehalt der oxydablen Substanzen. Wie schon erwähnt, soll bei allen geringen H_2O_2 -Konzentrationen, wie sie im lebenden Organismus auftreten, dem Enzym seine spezifische Reaktionsweise verloren gehen, und es wirkt als Peroxydase.

NACHWEISMETHODEN

Die frühen Untersuchungen beschränkten sich auf eine qualitative Bestimmung der Katalase, die dadurch erreicht wurde, daß auf Katalaseanwesenheit zu untersuchende Emulsionen, Schnitte und Suspensionen verschiedener Herkunft mit H_2O_2 zusammengebracht und auf Blasenbildung kontrolliert wurden.

Die groben Ergebnisse reizten zur Entwicklung genauerer Untersuchungsmöglichkeiten, die bald in der volumetrischen und titrimetrischen Methode gefunden wurden, die nicht nur den qualitativen Nachweis, sondern zum Teil auch eine quantitative Bestimmung ermöglichte.

TODA brachte die auf WARBURG und UYESUGI zurückgehende volumetrische Methode bei Leberkatalaseexperimenten erstmals mit der Katalaseforschung in Zusammenhang. Die Methodik mißt den bei der Katalasewirkung auf H_2O_2 gebildeten O_2 im Eudiometer, um daraus einen Rückschluß auf die Katalaseaktivität zu ziehen.

FUJITA und KODAMA gelang es, diese Methode in den Dienst der quantitativen Katalaseanalyse zu stellen, wobei die Anwendbarkeit bei Untersuchungen unterschiedlichen Materials (Gewebe, Bakterien) als besonderes Positivum galt. Die Enzymmenge wird von ihnen durch einen Quotienten, der sich wie folgt ermitteln läßt, angegeben:

$$Q_{\text{kat}} = \frac{\text{Die in 30 Min. entstandene } O_2\text{-Menge (mm}^3, 0^\circ\text{C, 760mm Hg)b. } 38^\circ}{\text{Trockengewicht (mg)}}$$

Der Quotient errechnet sich also, indem man nach völligem Temperatur- und Druckausgleich in der Versuchsanordnung die nach 30 Min. entstandene O_2 -Menge

durch das Trockengewicht des Untersuchungsmaterials dividiert. Zur Quotienten-
ermittlung dürften nur solche Werte berücksichtigt werden, bei denen die H_2O_2 -
Zersetzung in 30 Min. geringer als 0,1% ist, was gegebenenfalls durch Verdün-
nung der Katalasepräparate zu erreichen ist.

Die mit dieser Methode durchgeführten Untersuchungen der Bakterienkatalase
sind durch ihre Exaktheit ausgezeichnet, die nach Aussage von FUJITA und
KODAMA früheren Arbeiten von ORLA - JENSEN, RYWOSCH, SCHLUNK und
STAPP fehlt.

Die titrimetrische Methode, bei der die nach Unterbrechung der katalatischen
Reaktion restierende H_2O_2 -Menge gegen eine geeignete Titrierflüssigkeit (bevor-
zugt Kaliumpermanganat) bestimmt wird, fand in die Katalaseforschung noch
größeren Eingang, als die vorhin beschriebene manometrische. Ihre frühen Ver-
treter hatte sie in EULER, SENTER, HENNICHs und VIRTANEN und KARSTRÖM.
EULER stellte für die quantitative Bestimmung der Katalase einen Quotienten auf,
der sich aus der Reaktionskonstanten der H_2O_2 -Spaltung K und der angewandten
Fermentmenge ergab.

$$\text{Kat. f} = \frac{\text{Reaktionskonstante } K \text{ (pH 6,5; } 0^\circ \text{C)}}{\text{Trockengewicht in g in 50 ccm Lösung}}$$

1925 benutzten VIRTANEN und KARSTRÖM diesen Quotienten bei quantitativen
Bakterienkatalaseuntersuchungen, indem sie in den Nenner der Formel die je-
weils ermittelte Bakterienzellzahl setzten.

Im letzten Jahrzehnt kam sie in der von LANG, RIEDERER VON PAAR und BÖHM
abgeänderten Form auch bei den richtungsweisenden Untersuchungen der Thermo-
labilität der Bakterienkatalase in Anwendung.

THERMISCHE EINFLÜSSE AUF DIE WIRKSAMKEIT

Die Erkundung der Abhängigkeit der Katalaseaktivität von äußeren Einflüssen be-
rücksichtigte frühzeitig auch die Temperaturabhängigkeit. So beschrieb LOEW
schon einen unterschiedlichen Temperatureinfluß auf die Wirksamkeit des von
ihm aus Tabakblättern isolierten Enzyms, je nach dem, ob sich das Ferment bei
der Wärmebehandlung in wäßriger Lösung oder im Trockenzustand befand. EULER
führte im Zusammenhang mit Katalaseaktivitätsbestimmungen den Begriff der
"Tötungs- oder Destruktionstemperatur" ein. Er definierte ihn als diejenige Tem-
peratur, bei der ein Enzym in wäßriger Lösung ohne sein Substrat bei optimalem
pH nach einer 30 Min. langen Einwirkung in seiner Aktivität zur Hälfte vermindert
wird.

Der Blutkatalaseforschung brachten die Untersuchungen BINGOLD's mit Ferment-

präparaten verschiedener Tierblutarten einen exakten Einblick in das Abhängigkeitsverhältnis der Katalase von der Temperatur.

JORNS und STAPP beleuchteten erstmals den Temperatureinfluß auf die Fermentaktivität bei Mikroorganismen. STAPP fand einen absoluten Aktivitätsausfall bei *B. prodigiosum*, wenn er 15 Min. auf 80°C erhitzte; zu ähnlichem Ergebnis kam JORNS bei dem gleichen Bacterium (70°C -- 15 Min.).

Bei der Hefe bemerkten BLIX und EULER eine außerordentliche Aktivitätssteigerung, wenn sie für 30 - 120 Min. auf 55 - 63° erhitzten.

VIRTANEN und KARSTRÖM konnten die Wärmeaktivitätssteigerung beim *B. prodigiosum* und *M. Freudenreichii* nicht bestätigen. Die subtilen Ergebnisse der Blutkatalaseexperimente BINGOLD's veranlaßten 1953 RIEDERER VON PAAR unter Anleitung von LANG ähnliche Versuche mit Bakterienaufschwemmungen von *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus SG 511*, *B. coli* und *Pneumococcus mucosus* durchzuführen.

Ihr Resultat war im Gegensatz zu den Ergebnissen BINGOLD's bei der Blutkatalase nicht die Ermittlung einer bestimmten Tötungstemperatur, sondern das Auftreten eines charakteristischen, für jede Bakterienart unterschiedlichen Zerstörungsreichs. Die von BÖHM auf weitere Bakterienarten ausgedehnten Experimente führten zu gleichem Ergebnis.

EIGENSCHAFTEN UND BEDEUTUNG DES BACTERIUM COLI

ESCHERICH entdeckte 1886 das Bact. coli, dessen morphologisches, biochemische und kulturelles Verhalten heute weitgehendst geklärt ist.

Über das serologische Verhalten des E. coli bestand lange Zeit eine nicht zu bewältigende Unklarheit. Von allen Seiten wurden sich zum Teil widersprechende Beiträge zu diesem Problem veröffentlicht. DUDGEON fand das Krankenserum an Coliinfektion der Harnorgane Befallener bedeutend agglutinationsfähiger, gegenüber verschiedenen Colikeimen, als das Serum Gesunder. MEYER und LÖWENBERG sprachen dem hämolysierenden Colityp ein serologisch einheitliches Verhalten zu, hämolytische und anhämolytische Stämme zeigten eine gewisse serologische Verwandtschaft. BITTER und GUNDEL widersprachen der Auffassung Letztgenannter, bestätigten aber die Polyvalenz der Sera Infizierter gegenüber der Gesunder.

1947 erbrachten die Veröffentlichungen KAUFMANN's eine Klärung hinsichtlich des serologischen Verhaltens der Colibakterien und die Möglichkeit einer Unterscheidung von verschiedenen Typen. Nämlicher fand verschiedene Antigengruppen, die er als O-(Körper-) Antigen, H-(Geißel-) Antigen und K-(Kapsel-) Antigen bezeichnete. Die große Zahl der verschiedenen Antigene, gepaart mit ihrem teilweise thermolabilen oder thermostabilen Verhalten, erlaubte es ihm unter Mitarbeit von VAHLNE und KNIPSCHILDT, eine Einteilung der Bakterien durch serologische Analysierung durchzuführen.

ESCHERICH hatte 1886 die Colibakterien als Saprophyten beschrieben, deren Standort der Dickdarm sei. Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung dieser Symbionten ist bisher der Eingriff in den fermentativen Abbau der Nahrungsmittel, die Synthese von Vit. K und B und die antagonistische Wirkung auf die Fäulnis-erreger bekannt geworden.

Die parasitäre Eigenschaft des E. coli wurde erstmals durch LARUELLE zur Debatte gestellt, der den Keim aus dem Exsudat von Perforationsperitonitiden isolieren konnte. Seitdem sind die Colibakterien bei Mensch und Tier als Anlaß verschiedener Erkrankungen innerhalb und außerhalb des Darmes bestätigt worden; so bei der Darmdysbakterie, Entzündungen des Peritoneums, der Gallenblase, des Urogenitaltraktes, der Meningen und vor allem bei der Säuglingsdyspepsie. Beim Tier sind sie als ätiologischer Faktor bei der Kälberruhr und dem Schweinerotlauf bekannt. Die Frage nach der Pathogenität bestimmter Colitypen blieb lange wegen der Unmöglichkeit der Differenzierung nicht beantwortet.

VON LOGHEM warf die Frage eines Zusammenhangs zwischen Saprophyten- und

Parasitentum einerseits und Variabilität andererseits auf. Er bezog sich dabei auf die variantenarmen Typhus- und die zur Umwandlung neigenden Colibakterien. ANSELMI wollte in diesem Zusammenhang bei aus pathologischen Prozessen isolierten Stämmen eine geringere Umwandlungsneigung, als bei Stämmen aus dem Dickdarm gesunder Menschen bemerkt haben.

Die KAUFMANN'sche serologische Einteilung brachte die Möglichkeit, das häufige Vorkommen einzelner Serotypen bei bestimmten Coliinfekten nachzuweisen. Dieses Ergebnis bestätigte ADAM, der schon vor 30 Jahren der Meinung war, daß die Säuglingsdyspepsie durch ganz bestimmte Colitypen ausgelöst werden könnte. Er sah seine als pathogen betrachteten und "Dyspepsiecoli" benannten Typen A I und A IV identisch mit den Serotypen 0 55 und 0 111.

LINZENMEIER berichtet, daß die Erweiterung des serologischen Bestecks im letzten Jahrzehnt die Verantwortlichkeit weiterer, bis dahin unbekannter Serotypen für Säuglingsdyspepsien und verschiedene Tiererkrankungen gezeigt habe. Die häufige klinisch unerfreuliche Mehrfachresistenz der Colibakterien gegen die, bei der Therapie gebräuchlichsten Antibiotica (Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol und Neomycin), hat dem Bakteriologen die Erkennung neuer Typen erleichtert. Die Resistenz wird als Beweis dafür gewertet, daß die Typen in früheren Jahren unerkannt als ätiologischer Faktor bei Coliinfektionen mitgespielt haben. Bezüglich der Therapie hat die Resistenzentwicklung die Herstellung neuer Chemo-therapeutika, wie Polymyxin und Nitrofuraxon erfordert. Aus klinischen Gründen spielt die Bestimmung des Resistenzbildes für jeden Colistamm heute eine bedeutende Rolle.

BISHERIGE ERGEBNISSE DER KATALASEFORSCHUNG

Viele, die katalatische Wirksamkeit verschiedener Bakterien beleuchtende Untersuchungen haben diese Fähigkeit auch beim *Bact. coli* bestätigt. GOTTSTEIN sah bezüglich der Spaltungskraft keinen Unterschied zur Hefe, die allgemein für ihre energische Katalasewirkung bekannt ist. Die manometrische Untersuchung von RYWOSCH ergab für das *Bact. coli* eine im Vergleich zu den anderen Keimarten an der unteren Grenze liegende Zersetzungsfähigkeit. Lediglich die Typhus- und Paratyphusbakterien zeigten noch geringere Wirksamkeit.

VIRTANEN und KARSTRÖM kamen zu ähnlichen Resultaten bei in zuckerfreier Bouillon gezüchteten Keimen, während sie bei länger als 24-stündiger Züchtung unter Zuckerzusatz keine Katalaseaktivität beobachten konnten. Das Ergebnis resultiert aus dem Umstand, daß bei längerer Züchtung in zuckerhaltigem Medium durch die Säurebildung der pH-Wert unter 4,5 sinkt, was mit dem Leben und der Katalasetätigkeit des *E. coli* nicht mehr vereinbar ist. FUJITA und KODAMA ermittelten auf volumetrische Weise einen Katalasequotienten, der die früheren Ergeb-

nisse bestätigte. BÖHM mußte bei Versuchen mit Colibakterien die Suspensionen um das Vierfache derer mit anderen Bakterien verstärken, um eine meßbare Katalaseaktivität zu erzielen.

RIEDERER VON PAAR und BÖHM überprüften in ihren Erkundungsarbeiten über den Temperatureinfluß auf die Katalaseaktivität bei Bakterien erstmals auch genauer einige Stämme von *E. coli*, nachdem die 1964 von GIUSTI durchgeführten Experimente wegen ihrer Oberflächlichkeit nach Angabe RIEDERER VON PAAR's keinen Aussagewert haben. GIUSTI hatte den Aktivitätsabfall erst von 30°C aufwärts berücksichtigt und dabei für das *Bact. coli* einen Zerstörungsbereich von 27 Temperaturgraden ermittelt.

Die von RIEDERER VON PAAR mit Colistämmen gesunder Erwachsener durchgeführten Versuche ergaben eine Katalaseaktivitätsabnahme zwischen 50 - 85°C als Charakteristikum von *E. coli*.

Er stellte ferner eine Nichtauswertbarkeit der Hälfte aller für die Aktivitätsmessung überimpften Stämme fest und fand bei mehreren Messungen bei demselben Temperaturgrad den Aktivitätsabfall eines Stammes oft unterschiedlich. 1964 erbrachten die BÖHM'schen Versuche eine Ergänzung dadurch, daß ein Stamm (*E. coli* O1 K12 H-7) ermittelt wurde, der ganzlich andere Verhaltensweise demonstrierte. Bei ihm lag der Aktivitätsabfall zwischen 48 und 55°C, vollzog sich damit bei bedeutend niedrigerer Temperatur und rascher, als bei allen bisher beobachteten Stämmen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN PATHOGENER COLISTÄMME

a) Pathogene Bedeutung der Untersuchungsstämme

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mit Colibakterien verschiedener Serogruppen durchgeführt, die von 1959 - 1962 aus Untersuchungsproben mehrerer Kliniken des Voralpenlandes im Max von Pettenkofer-Institut der Universität München und in den veterinärmedizinischen Instituten Schleißheim und Zürich isoliert wurden. Die untersuchten Typen gelten als pathogen oder präsumptiv pathogen. Daneben wurde eine Anzahl serologisch nicht analysierter, bei Säuglingsdyspepsie aufgetretener Stämme untersucht.

Typ 0 4 wurde von TAYLOR beim Schweineödem isoliert. Nämlicher konnte ihn auch in Stuhlproben an Dyspepsie erkrankter Säuglinge im süddeutschen Raum finden. Die pathogene Bedeutung ist noch nicht geklärt; nach Angaben LINZEN-MEIER's ist er wahrscheinlich für den Menschen ungefährlich. Zur Untersuchung kamen 7 Stämme dieses Typs.

Typ 0 26 wurde 1951 von ØRSKOV im nordeuropäischen Raum angetroffen.

ADAM und RESEMANN gaben den ersten Hinweis auf sein Vorkommen in Deutschland. Er wird als pathogen, vorzugsweise das Tier befallend, beschrieben; aber auch Säuglingsdyspepsien sind ätiologisch auf seine Anwesenheit hin gedeutet worden. ADAM glaubt an seine Identität mit dem von ihm beschriebenen Pyuriecoli. Die epidemische Infektiosität ist geringer, als bei den Typen 0 55 und 0 111. Bei der Untersuchung wurden 2 Stämme berücksichtigt.

Typ 0 55 gilt als weltweit verbreiteter Erreger von Durchfallserkrankungen des Säuglings und wird gelegentlich bei der Mastitis der Rinder angetroffen. Er ist identisch mit den Typen:

ADAM:	Dyspepsiecoli A I
SMITH:	B.coli, type beta
LAURELL:	B.C.A., B.coli Aberdeen

Gefürchtet wird seine starke endemische und epidemische Kraft. Zwei Stämme dieser Serogruppen wurden untersucht.

Typ 0 78 wurde ursprünglich als tierpathogen eingestuft; bevorzugt trat er bei der Kälberruhr auf, wie FEY berichtet. In den letzten Jahren wurde er von LINZENMEIER bei Säuglingsdyspepsien im Voralpenraum angetroffen. Mit 31 Stämmen stellt er das Hauptkontingent aller untersuchten Gruppen.

Typ 0 114 trat 1956 in England als Erreger infantiler Gastro-Enteritiden in Erscheinung. 1958 gelang dem Max-von-Pettenkofer-Institut unter Mitarbeit TAYLOR's der Nachweis in Süddeutschland; 3 Stämme dieses Typs wurden in die Untersuchung einbezogen.

Typ 0 127 und 0 128 waren nach Angaben TANNER's, EWING's und TATUM's ursprünglich in Amerika und England beheimatet. Ihr Übergreifen auf das Rhein-Main-Gebiet wurde 1959 von FRIEDERISZICK bemerkt. Sie gehen als hochinfektios und resistent. Fünf Stämme wurden berücksichtigt.

Typ 0 ? : Hierin gehören 16 Stämme, die bei dyspepsiekranken Säuglingen isoliert wurden und mit dem heutigen serologischen Besteck noch nicht analysiert werden können.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, das Katalaseverhalten von Colibakterien der vorhin beschriebenen Serogruppen unter thermischen Einflüssen zu untersuchen und eventuelle Besonderheiten gegenüber ähnlichen Arbeiten mit saprophytaren Colibakterien herauszustellen.

b) Methodik

Als Arbeitsgrundlage diente die von BINGOLD und LANG gemeinsam mit RIEDERER VON PAAR entwickelte und 1959 von BÖHM differenzierte Untersuchungsmethode.

Danach wird der zu untersuchende Keim auf eine Nahagarplatte überimpft und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank belassen. Zur Untersuchung wird dann eine Suspension hergestellt, indem mit einer sterilen Platinöse Keimmaterial (1 - 4 Ösen, je nach Katalaseaktivität der Bakterienart) der bebrüteten Agarplatte entnommen und in einem Reagenzglas mit 10 ml physiologischer NaCl-Lösung gleichmäßig verteilt wird. Die Suspension wird auf 10 Reagenzgläser mit je 1 ml der Aufschwemmung verteilt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Ein Versuchsgläschen der Serie wird für 10 Min. einem Wasserbad von 100°C ausgesetzt, abgekühlt und aufbewahrt. Ein weiteres Reagenzglas, welches nur auf Zimmertemperatur gehalten wurde, dient neben dem, dem Kochwert ausgesetztem Röhrchen als zweites Kontrollgläschen. Hintereinander werden nun die übrigen Gläschen jeweils für 30 Min. einer bestimmten Untersuchungstemperatur im Thermostat ausgesetzt, abgeschreckt und aufbewahrt. In alle 10 Röhrchen werden mit einer sterilen Pipette 0,5 ml einer 1%-igen H₂O₂-Lösung gegeben und nach kurzem Schütteln für 20 Min. der chemischen Reaktion überlassen. Darauf wird durch Zugabe von 2 ml 20%-iger Schwefelsäure die Umsetzung der H₂O₂-Lösung unterbrochen und ihr Rest durch Titration gegen n/10 Kaliumpermanganatlösung aus einer auf 1/100 ml geeichten Bürette bis zum Farbumschlag ermittelt.

Während von dem Titrationsergebnis des Kochwertröhrchens die Katalaseaktivität mit 0% angenommen wird, wird die des zweiten Kontrollröhrchens mit 100% angegeben. Die Katalaseaktivität der übrigen, verschiedenen Temperaturen ausgesetzten Gläschen läßt sich nach folgender Formel errechnen:

$$\frac{(b - c) 100}{b - a} = \text{Katalaseaktivität (in Prozent)}$$

a = Titrationsergebnis bei Zimmertemperatur

b = Titrationsergebnis bei 100°C

c = Titrationsergebnis bei bestimmter Untersuchungstemperatur

Beispiel:

a = 0,5 ml = 100%

Verbrauch b = 3,5 ml = 0%

an n/10 KMnO₄ c = 2,0 ml = 50%

$$\frac{(3,5 - 2,0) 100}{3,5 - 0,5} = 50 \%$$

Diese Methode mußte bei der Untersuchung pathogener Colikeime nach einigen Erprobungen dahingehend geändert werden, daß für jeden Temperaturwert, bei dem die Aktivität eines Bakterienstammes festzulegen war, auf eine neue Suspension zurückgegriffen wurde.

Das Experimentieren nach dem ursprünglichen Arbeitsgang, welches eine mehrstündige Aufbewahrung der Suspension einschloß, ergab bei den meisten der untersuchten Colistämme eine Aktivitätsabnahme bei niedrigeren Temperaturen, als bei Benutzung einer jeweils frischen Suspension. Lediglich einige Stämme zeigten keine wesentlichen Unterschiede ihres Verhaltens bei Anwendung beider Methoden.

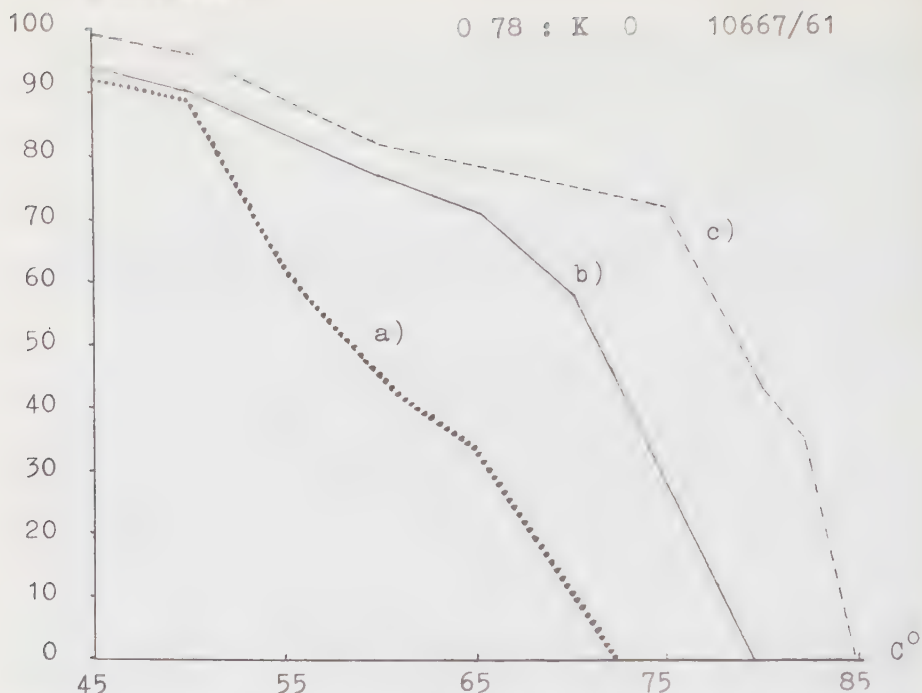
BÖHM erkannte bei Untersuchung des Staphylococcus SG 511 auf die Thermolabilität der Katalase, daß das Ferment einer über die Plattenkultur erhaltenen Bakterienaufschwemmung bedeutend resistenter war (75° - 78°C), als das einer Suspension, die durch Beimpfung und Bebrütung bei 37°C für 24 Std. in Originalbouillon direkt gewonnen wurde (63° - 66°C). Sie konnte diese Erscheinung weder durch Sauerstoffmangel, Verwendung verschieden alter Kulturen noch Stehenlassen von Aufschwemmungen erklären, sondern nur durch eine Abhängigkeit der Aktivität von der Suspensionskonzentration.

Bei den Colistämmen dürfte gerade die von BÖHM für Staphylococcus SG 511 verneinte Aktivitätsbeeinflussung durch eine längere Suspensionsaufbewahrung für das rasche Sinken der Katalasetätigkeit bei Anwendung der von ihr beschriebenen Methode verantwortlich sein.

Der Ersatz der NaCl-Lösung durch eine Tyrode-Lösung zur Herstellung einer Bakterienaufschwemmung konnte bei Verwendung der ursprünglichen Methodik den stärkeren Aktivitätsverlust bei tiefer liegenden Temperaturen deutlich mildern, ein Ergebnis, welches auf die Stabilisierung der Katalase durch das differenziertere Salzsystem der Tyrode-Lösung zurückgeführt werden könnte. Die höchsten Aktivitätswerte bei bestimmter Untersuchungstemperatur wurden aber stets dann erreicht, wenn für den jeweiligen Celsiusgrad, bei dem ein Stamm betreffs seiner Fermenttätigkeit untersucht werden sollte, eine neue Suspension bereitet wurde. Dieser Umstand könnte durch eine zeitlich eng begrenzte Katalasehaltbarkeit der Colibakterien erklärt werden.

Nachfolgendes Beispiel soll die angetroffenen Verhältnisse verdeutlichen:

- a) Aktivitätskurve bei Untersuchung einer Kochsalzlösungsaufschwemmung nach der ursprünglichen Methode.
- b) Aktivitätskurve bei Untersuchung einer Tyrodelösungsaufschwemmung nach der ursprünglichen Methode.
- c) Aktivitätskurve bei Untersuchung einer Kochsalzlösungsaufschwemmung nach der differenzierten Methode.



Der Kurvenvergleich zwischen a) und c) zeigt die Abhängigkeit der Katalaseaktivität von der Suspensionsaufbewahrungszeit, die zwischen 45° und 50°C minimal ist, von 50° aufwärts aber erheblich an Einfluß gewinnt. Unter der Bedingung einer jeweils 30-minütigen Einwirkung der Untersuchungstemperatur auf die Suspensionen und anschließender Reaktion von H_2O_2 auf die Aufschwemmungen für 20 Min. leitet sich aus dem Kurvenverlauf zwischen 45 und 50°C eine auf 30 Min. begrenzte Resistenz der Katalase gegen Lagerungseinflüsse ab.

Die Kurve b) verdeutlicht die Stabilisierung der Bakterienkatalase durch eine Tyrodelösung.

Um die Katalaselabilität nach 1 1/2-stündiger Aufbewahrung möglichst zu umgehen, wurde die Methode in Anwendung gebracht, die die größte Unabhängigkeit von ihr erbrachte und durch die Kurve c) ausgedrückt wird.

Es wurde eine Platinöse Keimmateriale, die nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C einer Standard I-Nähragarplatte der Firma Merck entnommen wurde, in 3 ml NaCl-Lösung aufgeschwemmt ⁺⁾ und auf 3 Reagenzgläschen zu je 1 ml verteilt.

⁺⁾ Aus Vorversuchen ergab sich für die Aufschwemmungen eine Öse Keimmateriale auf 3 ml NaCl-Lösung als zur Untersuchung ausreichende Konzentration. Dieser Wert stimmt mit Angaben von LANG, RIEDERER VON PAAR und BÖHM überein, die bei Thermostabilitätsuntersuchungen des Bact. coli 4 Platinösen auf 10 ml Kochsalzlösung verteilen.

Ein Röhrchen wurde im Thermostat für 30 Min. einer bestimmten Temperatur ausgesetzt und abgekühlt. Die zwei anderen Röhrchen dienten als Kontrollgläschen. Während das eine für 10 Min. in Wasser von 100°C gegeben wurde, blieb dasetzte auf Zimmertemperatur. Alle 3 Gläschen wurden dann mit je 0,5 ml 10%-iger H_2O_2 -Lösung beschickt und, wie eingangs beschrieben, weiterbehandelt. Für die Aktivitätsbestimmung bei dem nächsten interessierenden Temperaturgrad wurde dann wiederum eine Platinöse Keimmateriale entnommen und wie angegeben untersucht. Dieser Vorgang wurde für jeden Stamm so oft durchgeführt, bis eine Aussage über das Katalaseverhalten gemacht werden konnte. Mit jedem Stamm wurde die Untersuchung fünfmal wiederholt.

Wegen des großen Temperaturintervalls, das bei den Colibakterien zwischen einer 100%-igen und einer 0%-igen Fermentaktivität lag, konnte das Katalaseverhalten nicht für jeden Temperaturgrad aufsteigend, sondern nur alle 5 Grad, bzw. bei höheren Temperaturen alle 2 Grad, ermittelt werden. Lediglich bei einigen Stämmen, bei denen eine schnelle Inaktivierung auftrat, wurde der Abstand zwischen zwei gemessenen Temperaturwerten verringert. Die für jeden Stamm gemessenen Werte wurden in ein Koordinatensystem übertragen, wobei auf der Abszisse die Temperaturen und auf der Ordinate die dazugehörigen Aktivitätswerte in Prozent abgetragen wurden.

Diese Methode diente zur Untersuchung von 66 pathogenen Colistämmen der schon beschriebenen Serotypen.

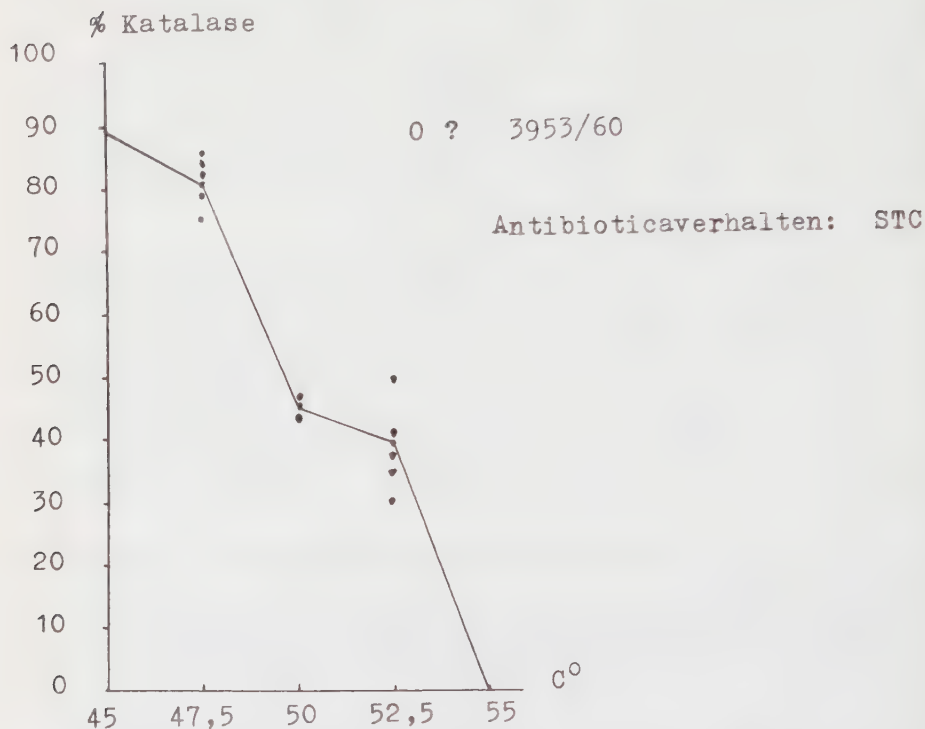
Die nachfolgende graphische Darstellung des Katalaseverhaltens mehrerer pathogener Colikeime gibt einen Überblick über die bei den Experimenten vorgefundenen Verhältnisse.

Das allgemeine Interesse, welches heute in der Dyspepsiecoliforschung der Wirkung der Antibiotica auf die Colibakterien entgegengebracht wird, und die Untersuchungen von COHN und MIDDLEBROOK mit Isonicotinsäure-hydrazid resistenten und empfindlichen Tuberkelbakterien veranlaßten zur Nachfrage nach dem Antibioticaverhalten der einzelnen Stämme im Max-von-Pettenkofer-Institut und zur Angabe des Resistenzbildes bei der graphischen Darstellung des Katalaseverhaltens der Stämme. Hierbei wird die volle Empfindlichkeit mit E, die Resistenz gegen einzelne Antibiotica durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Bezeichnung angegeben.

Streptomycin	= S
Tetracycline	= T
Chloramphelicol	= C
Kanamycin	= K
Neomycin	= N

Gegen die neueren, in der Dyspepsiecolithherapie benutzten Präparate Polymyxin, Framycetin und Nitrofurantoin wurde bisher keine Resistenz beobachtet.

c) Graphische Darstellung des Katalaseverhaltens einiger Colistämme

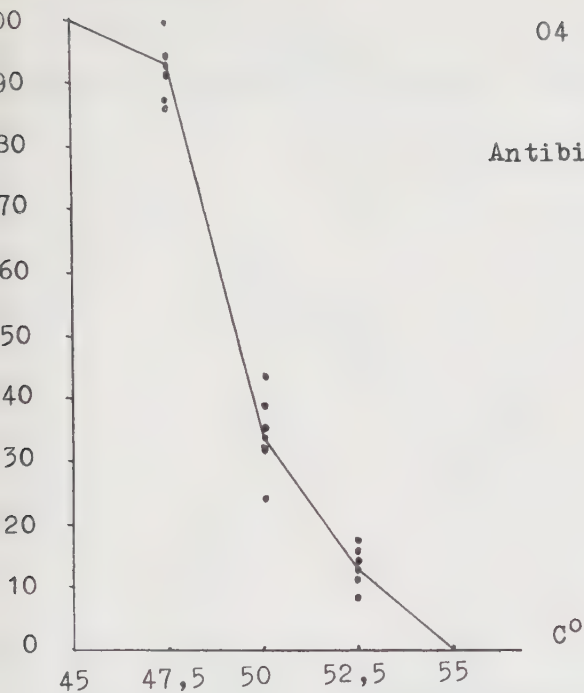


Der Stamm fällt durch stufenförmige Katalasezerstörung auf. Die bei 45°C auf 89% liegende Aktivität ist bei 47,5°C auf 81% gesunken. Bis 50°C sackt sie auf 45% ab, verweilt für 2,5°C ungefähr auf dieser Höhe, um bei 55°C die 0%-Grenze zu erreichen.

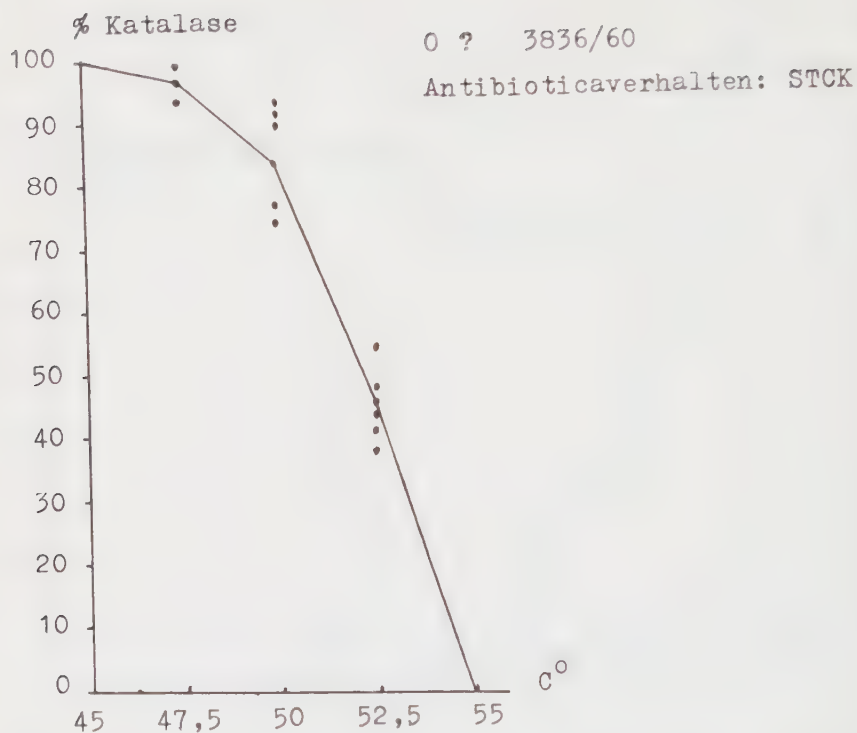
% Katalase

04 298/61

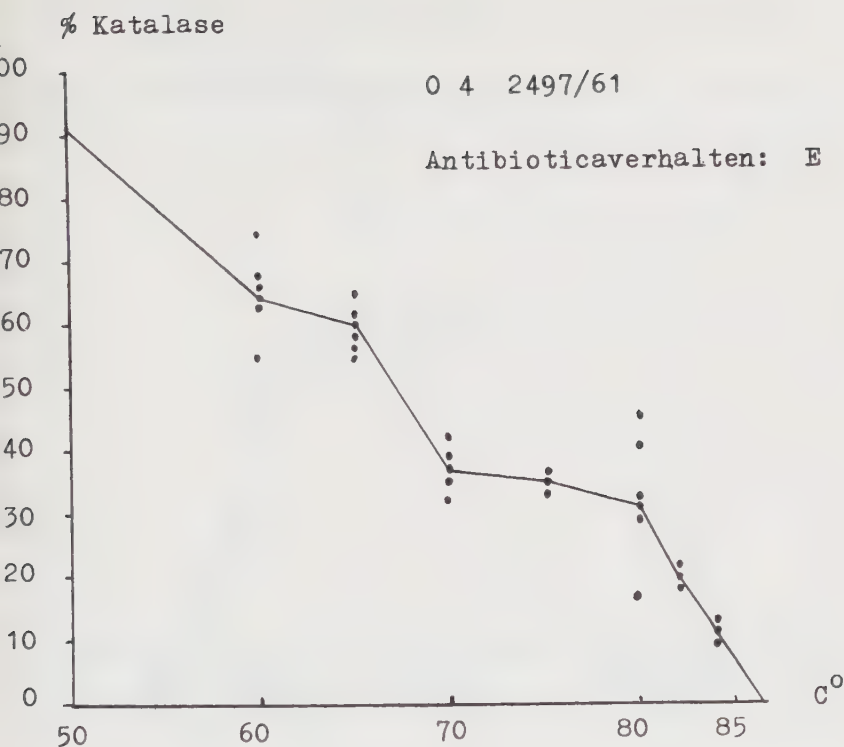
Antibioticaverhalten: E



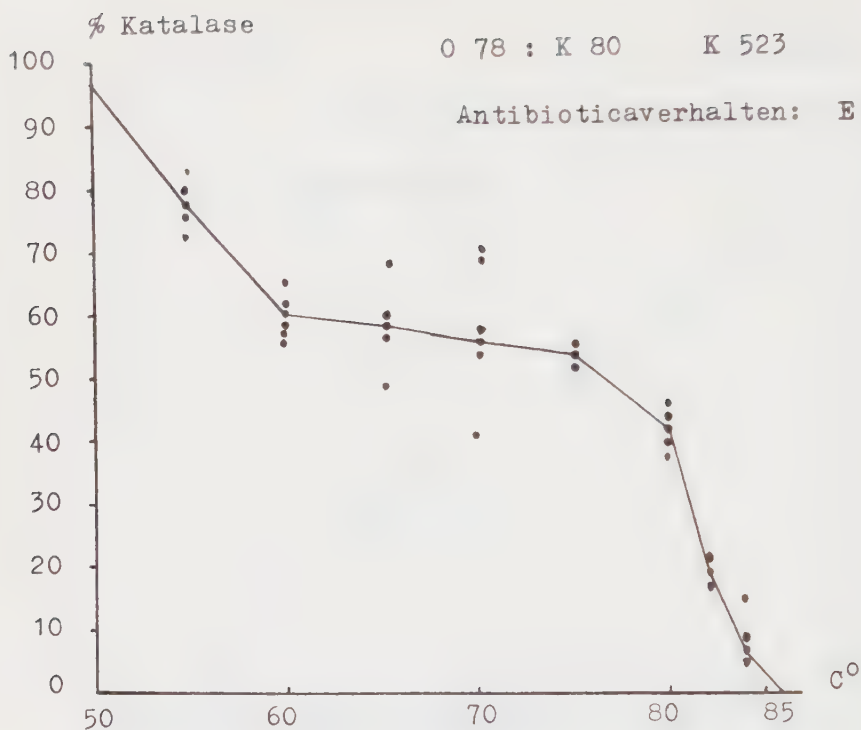
Der Zerstörungsbereich liegt zwischen 45 und 55°C. Während der Aktivitätsabfall bis 47,5°C auf 10% beschränkt bleibt, setzt bis 50°C eine rapide Zerstörung auf 4% ein. Die Restaktivität ist bei 55°C völlig geschwunden.



Die oberhalb 45°C einsetzende Inaktivierung ist bis 50°C auf 83% langsam fortgeschritten. Bis 55°C findet ein fast linearer völliger Aktivitätsverlust statt.



Der Stamm zeigt bei 50° eine Aktivität von 91%, die bei 60° auf 64% geschwunden ist und bis 65° ungefähr auf dieser Höhe verweilt. Zwischen 65 und 70° liegt die zweite Inaktivierungsphase auf 37%, ein Niveau, welches bis 80° gehalten wird. Die dritte Stufe, in der die Restaktivität schwindet, reicht bis 86°.

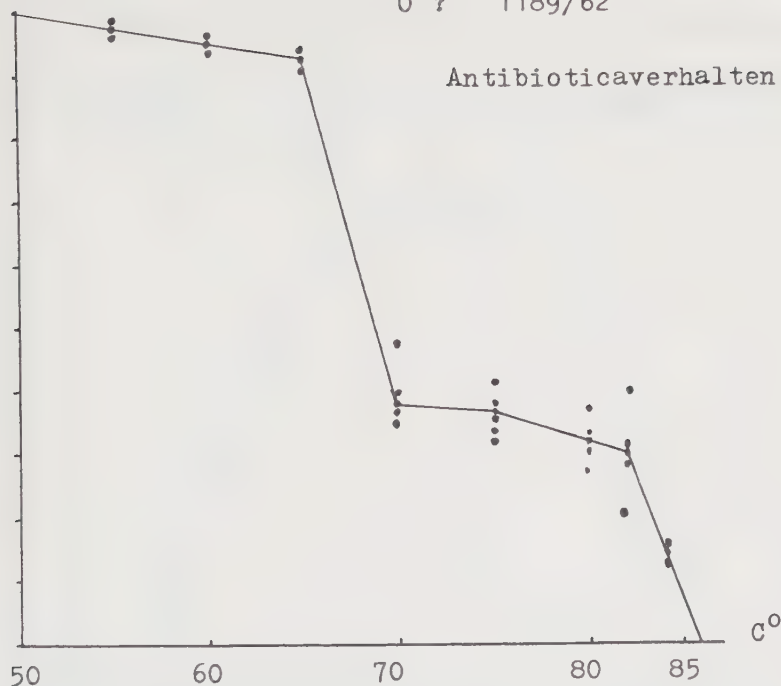


Der Zerstörungsbereich liegt zwischen 50 und 85°C. Die Inaktivierung vollzieht sich zweistufig. Bis 60°C sinkt die Aktivität um 40%, ist bei 75°C nur geringfügig um weitere 5% gesunken, und bei 86°C völlig verloren gegangen.

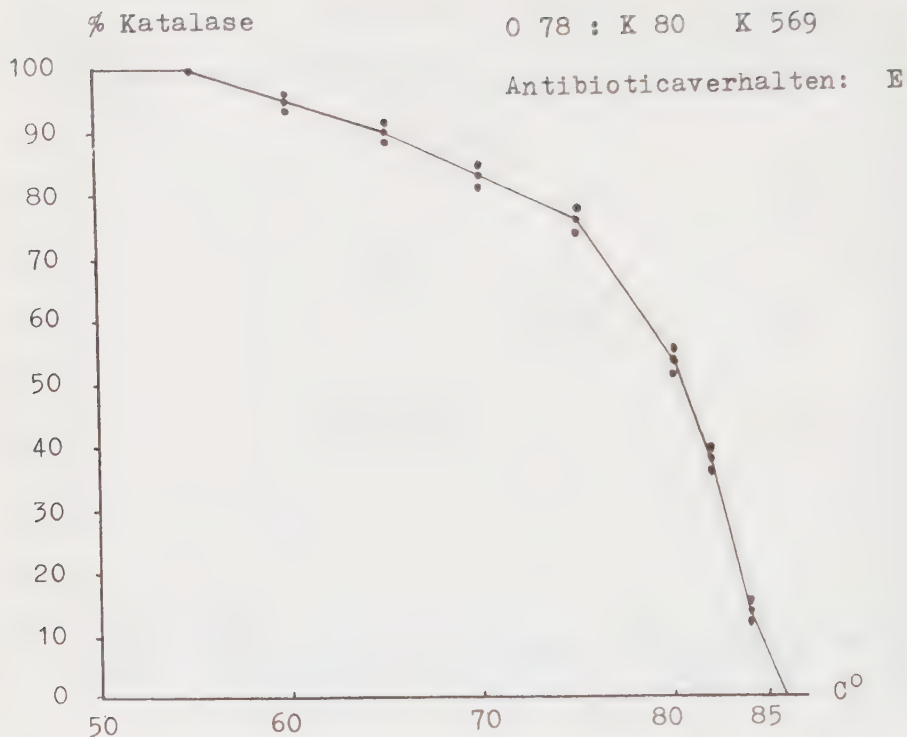
% Katalase

O ? 1189/62

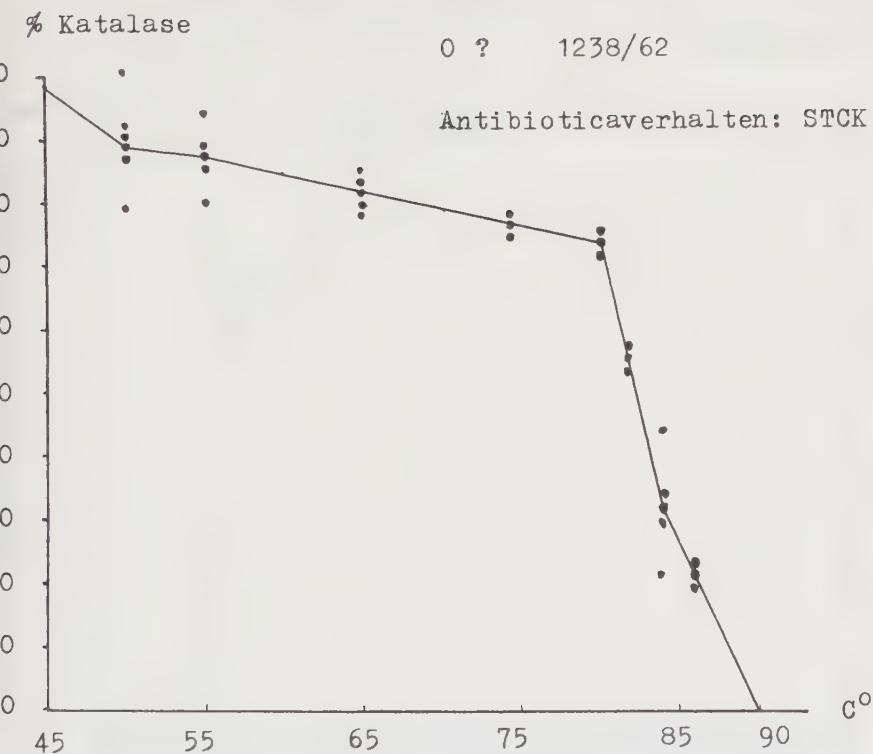
Antibioticaverhalten: ?



Die stärkere Fermentzerstörung beginnt bei 65⁰ und ist bei 70⁰ auf 36% fortgeschritten. Bis 82⁰ reicht die Phase, in der die Aktivität auf dieser Höhe verweilt. Zwischen diesem Temperaturwert und 86⁰ wird die Restaktivität zerstört.

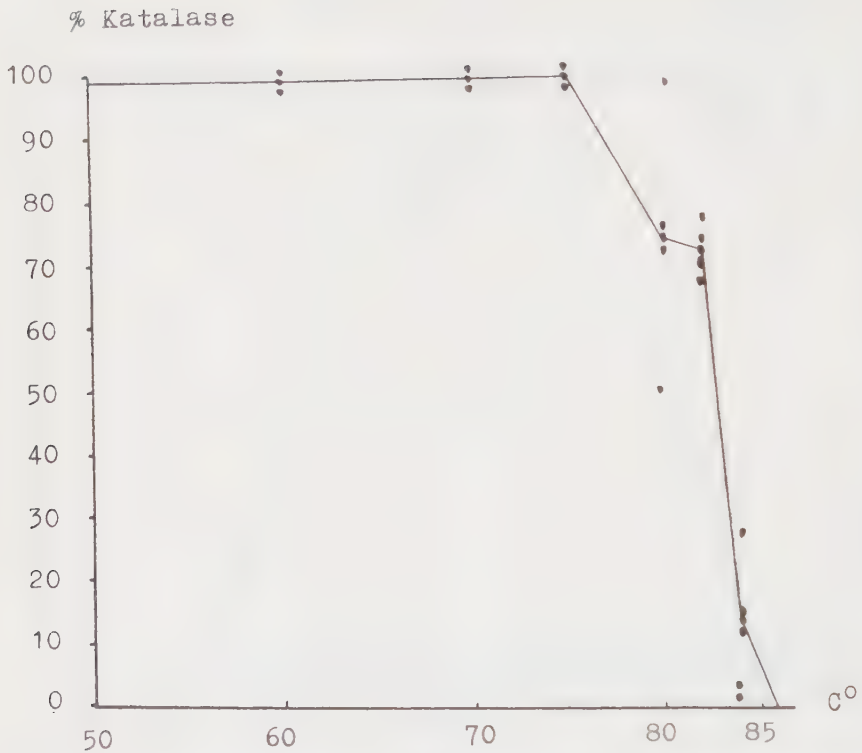


Die Inaktivierung beginnt bei 55°, sie bleibt bis 75° auf 25% begrenzt und nimmt dann schnell bis 86°, wo keine H_2O_2 -Spaltung mehr registriert werden kann, zu.



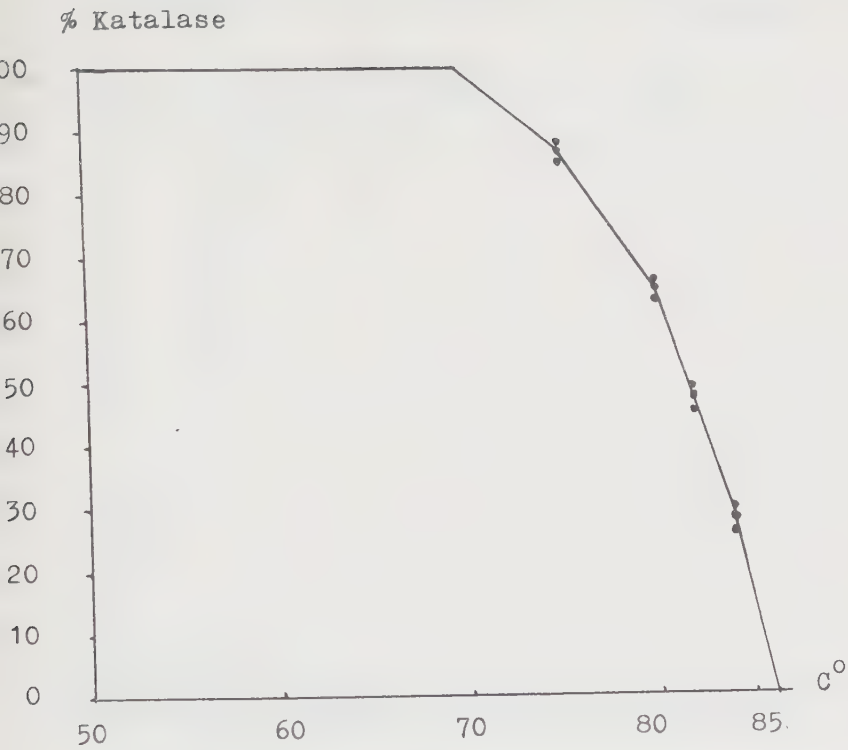
Einer Inaktivierung auf 88% bei 50° folgt bis 80° eine Zone, in der die Aktivität langsam auf 75% absinkt. Zwischen 80 und 88° liegt die Phase einer rasch fortschreitenden Katalasezerstörung. Die Verhaltensweise dieses Stammes leitet zu den Colibakterien über, deren Katalase gegen Temperatureinflüsse bis zu 70° resistent ist.

Antibioticaverhalten: TC



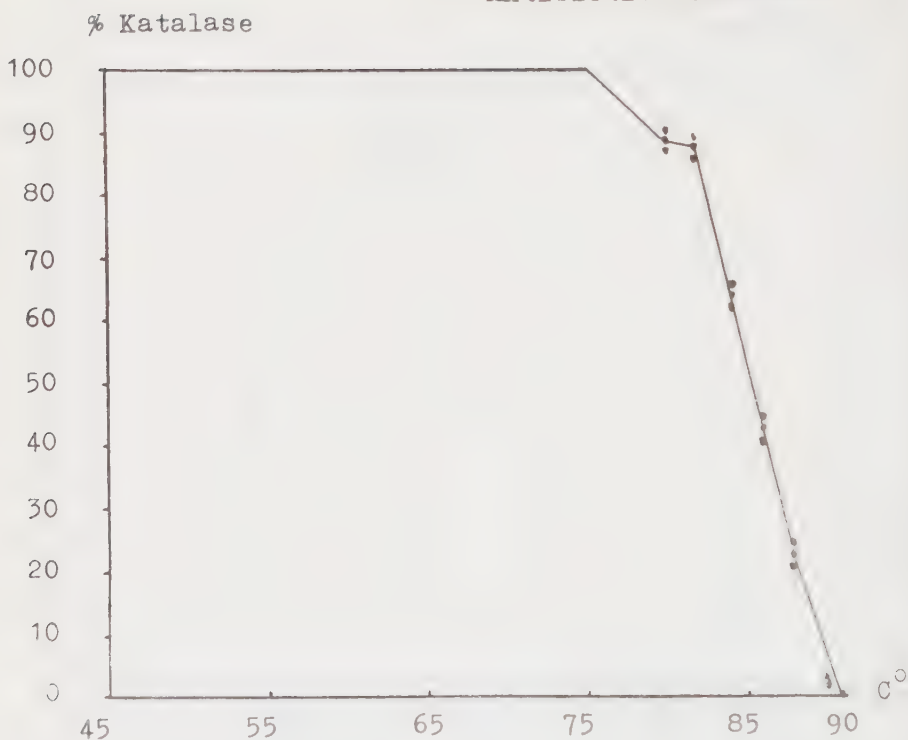
*Die Fermentzerstörung beginnt bei 75° und ist bei 85° abgeschlossen. Zwischen 80 und 82,5° liegt eine Phase geringer Aktivitätsabnahme.

Antibioticaverhalten: STC



Der Beginn der Inaktivierung liegt bei 70°. 75° kennzeichnet der hohe Aktivitäts-
wert von 88%, der bis 80° auf 65% fällt, um bei 86° die 0%-Grenze zu erreichen.

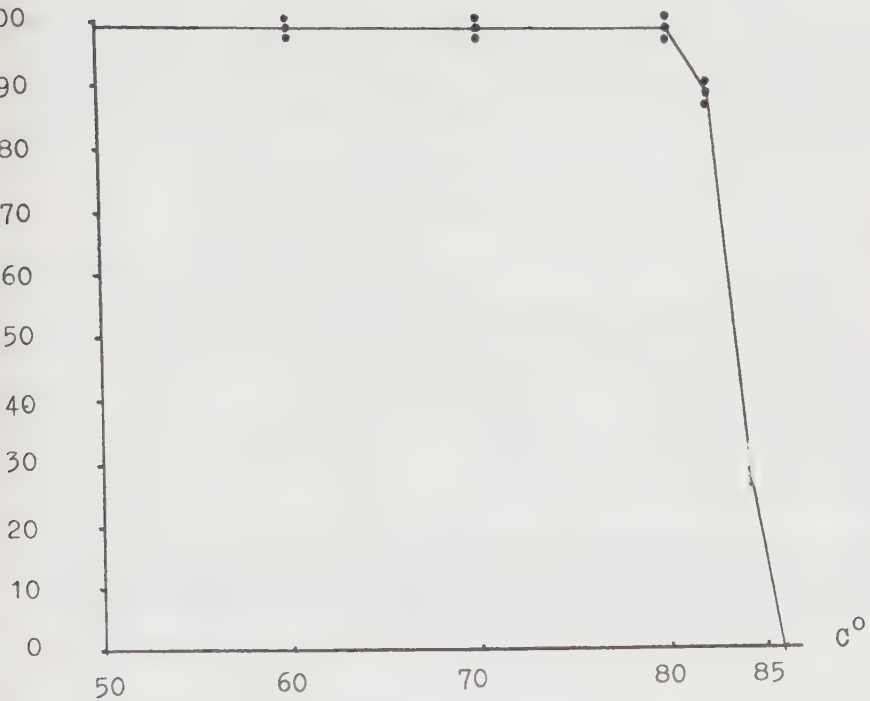
Antibioticaverhalten: E



Die Aktivitätsverminderung setzt bei 75° ein, bis 82,5° ist der Aktivitätswert auf 87% gefallen. Zwischen 82,5 und 90° liegt der Bereich der eigentlichen Fermentinaktivierung.

Antibioticaverhalten: STC

% Katalase



Im Vergleich zu allen untersuchten Stämmen zeigt dieser Typ bis 80° die größte Resistenz gegen thermische Einflüsse. Bis 82,5° kommt es zum Aktivitätsabfall auf 84%. Innerhalb eines 2,5° umfassenden Intervalls kommt es zur völligen Inaktivierung.

d) Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

Ergänzend zu den Katalasekurven einiger Colistämme sei eine Zusammenstellung der Mittelwertsergebnisse aller untersuchten Stämme in 3 Tabellen angefügt, die sich nach Gruppierung der Stämme ähnlichen Katalaseverhaltens herstellen lassen.

Unter Aufsuchung der Höchst- und Tiefstwerte bei den einzelnen Untersuchungstemperaturen in den Tabellen lassen sich für die Gruppen Inaktivierungsdiagramme mit den dazugehörigen Mittelwertskurven konstruieren. Alle bei den einzelnen Stämmen ermittelten absoluten Werte liegen mit wenigen Ausnahmen innerhalb dieser Diagramme.

TABELLE I

Stamm Nr.	Zim- mer- temp.	45°	47,5°	50°	52,5°	55°	57,5°	60°	Koch- wert	Resistenz- bild
04 298/61 100		<u>100</u>	94	<u>34</u>	<u>14</u>	-	-	-	0	E
04 5236/62 100		<u>86</u>	85	<u>59</u>	<u>56</u>	26	14	-	0	E
0? 3475/60 100		100	94	<u>87</u>	<u>53</u>	-	-	-	0	T
0? 3836/60 100		100	<u>96</u>	<u>83</u>	46	-	-	-	0	STCK
0? 3953/60 100		89	<u>81</u>	45	40	-	-	-	0	STC

Die Tabelle I umfaßt Stämme, deren Zerstörungsbereich zwischen 45 und 60°C liegt. Die Höchst- und Tiefstwerte der jeweiligen Untersuchungstemperatur sind in der tabellarischen Zusammenfassung unterstrichen.

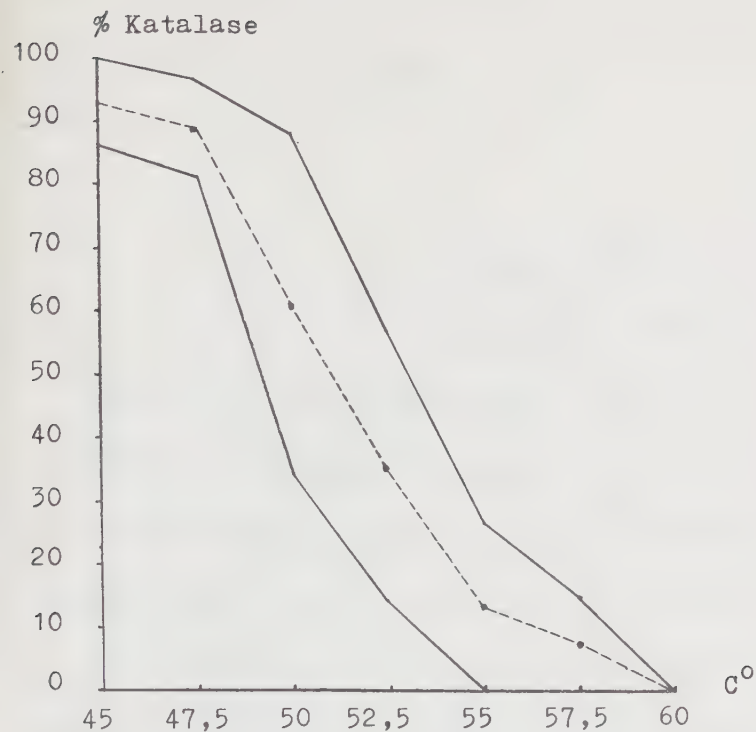


Diagramm zu Tabelle I

Das Schaubild gibt 47,5°C als den Beginn einer stärkeren Enzymbeeinträchtigung an. Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich, liegen bei 45°C, 47,5°C und 50°C drei Werte über und zwei unter dem Gruppenmittelwert. Bei 52,5°C liegen 4 Werte über und ein Wert unter dem Mittelwert, während bei 55 und 57,5°C die Verhältnisse umgekehrt sind.

TABELLE II

Stamm Nr.:	Zimmer- temp.:	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	82°	84°	86°	88°	90°	Koch- wert:	Resi- stenz- bild:
0 4	2497/61	100	91	78	65	60	37	36	20	11	-	-	-	0	E
0 4	744/62	100	92	90	88	84	82	77	59	28	11	-	-	0	E
0 26	?	100	90	76	73	72	72	72	49	36	8	-	-	0	?
0 78	8560/59	100	92	83	82	82	81	56	38	5	-	-	-	0	STC
0 78	371/60	100	94	93	93	92	82	78	29	6	-	-	-	0	T
0 78	1178/60	100	91	89	84	80	77	65	18	3	-	-	-	0	SC
0 78	9293/60	100	88	80	78	75	70	58	38	15	-	-	-	0	E
0 78	325/61	100	98	94	94	74	68	46	30	19	8	-	-	0	TC
0 78	7904/61	100	87	83	80	78	74	70	67	32	-	-	-	0	E
0 78	7908/61	100	90	82	79	76	76	75	47	37	22	6	-	0	E
0 78	9776/61	100	91	86	84	83	82	79	32	8	-	-	-	0	STC
0 78	9818/61	100	94	83	79	74	74	42	42	11	-	-	-	0	STCK
0 78	9904/61	100	92	88	82	78	72	69	14	-	-	-	-	0	S
0 78	10362/61	100	92	87	87	87	76	49	18	-	-	-	-	0	T
0 78	10667/?	100	98	96	82	74	73	73	36	14	-	-	-	0	?
0 78	K 216	100	92	86	80	72	68	43	20	8	-	-	-	0	E
0 78	K 244	100	93	86	86	86	86	50	12	3	-	-	-	0	E
0 78	K 471	100	93	81	80	78	78	77	18	-	-	-	-	0	E
0 78	K 482	100	97	93	88	83	83	62	24	5	-	-	-	0	E
0 78	K 523	100	96	77	60	58	56	54	42	6	-	-	-	0	E
0 78	K 569	100	100	100	95	90	82	76	38	13	-	-	-	0	E
0 78	K 634	100	92	85	79	72	68	68	9	-	-	-	-	0	E

TABELLE II (Fortsetzung)

Stamm Nr.:	Zimmer- temp.:	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	82°	84°	86°	88°	90°	Koch- wert	Resi- stenz- bild:
0 78 K 785	100	92	86	81	77	72	56	<u>18</u>	<u>3</u>	-	-	-	-	0	E
0 78 K 1057	100	92	83	81	80	80	61	50	20	6	-	-	-	0	E
0 78 Vet 2	100	94	92	91	90	63	62	42	22	8	-	-	-	0	E
0 ? 884/60	100	89	87	85	85	85	60	44	18	-	-	-	-	0	E
0 ? 4909/60	100	98	92	86	80	73	60	59	28	11	-	-	-	0	T
0 ? 1188/62	100	96	77	<u>58</u>	<u>56</u>	41	37	26	11	4	-	-	-	0	?
0 ? 1189/62	100	<u>100</u>	97	<u>95</u>	<u>93</u>	38	37	33	31	16	-	-	-	0	T
0 ? 1238/62	100	89	88	85	82	80	78	<u>76</u>	58	32	23	-	-	0	?
0 ? 1747/62	100	91	88	86	79	73	65	58	55	48	<u>30</u>	<u>10</u>	-	0	STC

Tabelle II enthält Stämme, deren stärkere Fermentzerstörung zwischen 50 und 90°C liegt.

% Katalase

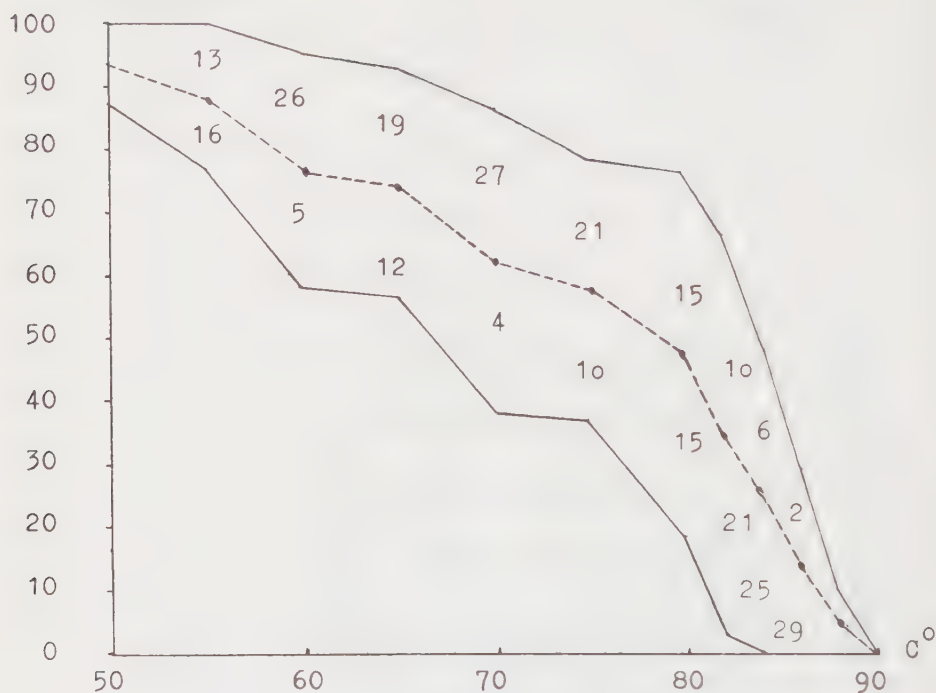


Diagramm zu Tabelle II

Die Zahlen zwischen den Höchst- und Tiefstwertmarkierungen und der Mittelwertskurve geben Aufschluß über die Anzahl der Stämme, deren Aktivität bei den einzelnen Untersuchungstemperaturen ober- bzw. unterhalb der errechneten Mittelwerte lag. Während bei 55° die Zahl der über und unter dem Mittelwert liegenden Werte ungefähr gleich ist, zeigen die meisten Stämme zwischen 60 und 80° eine über der Kurve liegende Aktivität. Zwischen 82 und 90° kommt es zur Umkehr der Verhältnisse.

TABELLE III

Stamm Nr.:	Zimmer- temp.:	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	82°	84°	86°	88°	90°	Koch- wert:	Resi- stenz- bild:
0 4	1641/61	100	98	96	96	96	85	60	43	15	5	-	-	0	E
0 26	5204/62	100	98	98	98	98	64	64	64	35	-	-	-	0	E
0 78	8987/59	100	100	100	100	100	100	88	87	64	42	23	-	0	E
0 78	381/60	100	97	94	94	94	83	68	34	11	-	-	-	0	E
0 78	511/60	100	100	96	94	93	92	85	78	46	23	9	-	0	E
0 78	4011/60	100	92	92	90	88	87	56	51	37	17	-	-	0	E
0 78	10487/61	100	93	93	93	92	86	67	67	57	40	19	-	0	E
0 ?	3527/59	100	99	99	99	99	99	74	71	14	-	-	-	0	?
0 ?	4406/59	100	99	99	99	98	98	97	88	28	-	-	-	0	STC
0 ?	4695/59	100	100	100	100	100	86	65	48	28	-	-	-	0	STC
0 ?	5198/59	100	97	95	91	90	75	48	30	4	-	-	-	0	STC
0 ?	4289/60	100	93	92	92	91	75	60	45	17	-	-	-	0	STC
0 ?	8728/60	100	98	98	96	95	93	92	62	38	5	-	-	0	TC
0 ?	1190/62	100	92	90	90	90	85	74	68	57	30	-	-	0	?

Tabelle III nimmt Stämme auf, deren Zerstörungsbereich zwischen 70 und 90°C liegt.

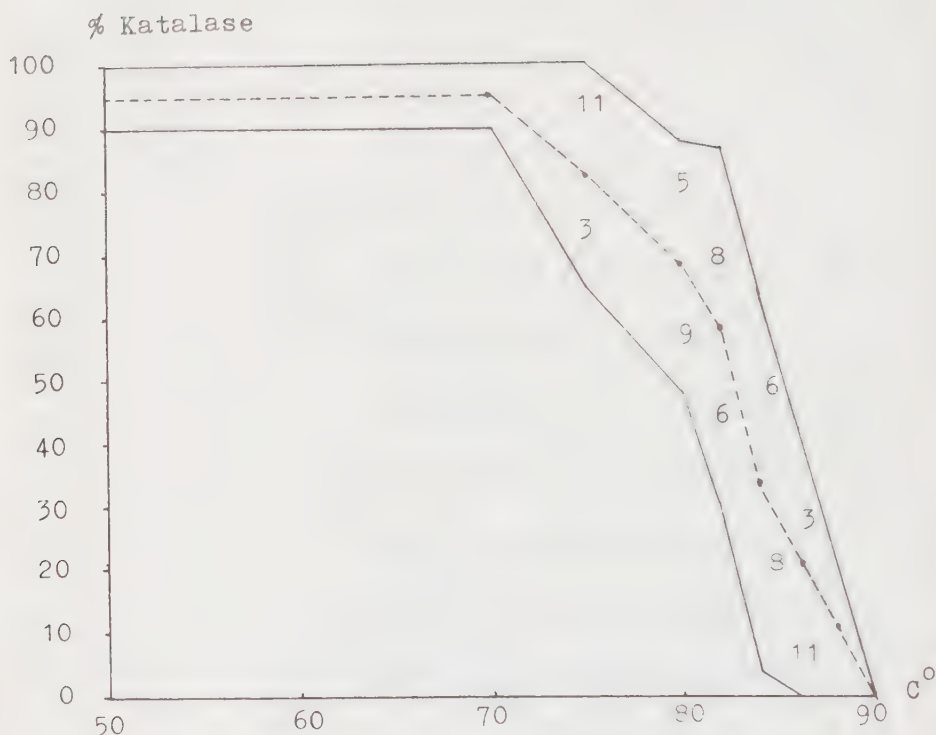
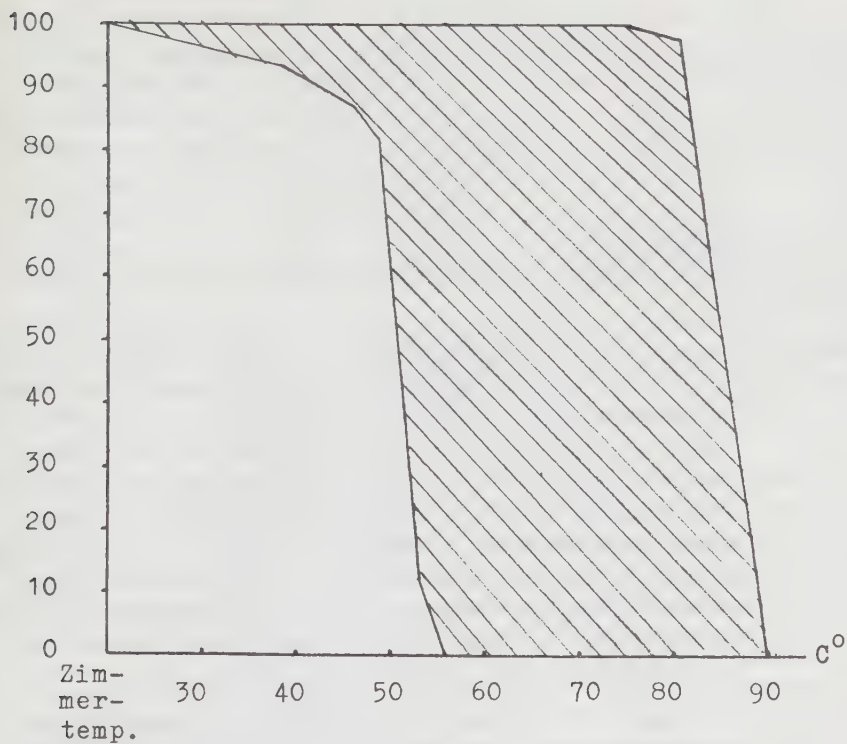


Diagramm zu Tabelle III

Bei 75° zeigen die meisten Stämme über dem Mittelwert liegende Aktivität, während von 80° aufwärts die Mehrzahl der Stämme katalaseschwächer ist, als die Kurve es ausdrückt. Bei 82° ist nochmals die Mehrheit der Stämme durch stärkere Aktivität gekennzeichnet.

In allen drei Diagrammen ist die Differenz zwischen den Höchst- und den dazugehörigen Tiefstwerten imponierend. Hierbei wurden Abstände bis zu 60% gemessen.

% Katalase



Zerstörungsbereich

Das Schaubild verdeutlicht den Zerstörungsbereich aller untersuchten Colibakterien. Danach ist eine stärkere Fermentinaktivierung zwischen 45 und 90°C möglich.

C. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die aus den Voruntersuchungen hervorgegangene Auflage der Verteilung von einer Platinöse Keimmaterial auf 3 ml NaCl-Lösung, um eine Katalaseuntersuchung überhaupt durchführen zu können, reiht die pathogenen Colibakterien in die Gruppe der katalaseschwachen Mikroorganismen ein und stimmt mit Ergebnissen von RIEDERER VON PAAR und BÖHM überein, die die Aufschwemmungskonzentration zu Katalaseuntersuchungen um das 4-fache steigern mußten gegenüber gleichen Experimenten mit Staphylokokken, *Pyocyanus*, *Proteus*, *Enteritis*, *Paratyphus*- und Ruhrbakterien.

Das vorgefundene Katalaseverhalten ließ eine Einteilung der Colistämme in 4 Gruppen zu:

1. Gruppe: Stämme, die bei der Konzentration von einer Platinöse Keimmaterial auf 3 ml NaCl-Lösung keine zur exakten Erkundung ausreichende Katalaseaktivität entwickelten. Ob diese Stämme tatsächlich äußerst fermentschwach sind, bleibt ungeklärt. Bei Vergrößerung der Konzentration auf das Doppelte konnte keine Erhöhung der Aktivität festgestellt werden. Die Katalaseschwäche dieser Stämme könnte als Ausdruck anderer exogener Faktoren auf die Colikatalase gedeutet werden, die vielleicht in eine Parallele zur Blutkatalase von Taube, Ente und Gans zu stellen wäre. Für das Fehlen der Blutkatalase dieser Tiere schon bei Zimmertemperatur konnten LANG und PABST mechanische Einflüsse verantwortlich machen.

Sechzehn der 66 erfaßten Stämme wurden hier eingestuft, da sie eine Differenz der Titrationsergebnisse zwischen 100 und 0 %-iger Aktivität, die über eine auf 1/100 ml geeichte Bürette ermittelt wurde, von weniger als 1 ml aufwiesen.

2. Gruppe: Stämme, deren kritische Katalasezerstörung zwischen 45 und 60°C lag. Diese Verhaltensform zeigten 5 Stämme. Als kritische Zerstörung sei in Anlehnung an Böhm der Abfall unter 90% definiert.

3. Gruppe: Stämme, die ein weiter Zerstörungsbereich zwischen 45 und 90°C kennzeichnete.

Sie umfaßt mit 31 Vertretern die Mehrzahl des Untersuchungsmaterials. Das Verhalten ist bei einem Teil der Stämme dieser Gruppe durch eine zweiphasige Inaktivierung charakterisiert. Einer Anfangsphase beschränkter Aktivitätsabnahme folgt ein Bereich relativ gleichbleibender Wirkung, der von einer Zone, in der die restliche Aktivität schwindet, abgelöst wird. Der andere Teil der Stämme

zeigt einen langsam fortschreitenden Wirkungsverlust ohne Zwischenschaltung einer Zone gleichbleibender Fermenttätigkeit.

4. Gruppe: Stämme, bei denen unterhalb 70°C keine kritische Inaktivierung eruiert werden konnte.

In diese Gruppe gehören 14 Stämme, die zwischen 85°C und 90°C völlig katalasefrei wurden.

Der absolute Inaktivierungsbereich lag zwischen Zimmertemperatur und 90°C. Er imponierte damit durch seine immense Breite. Die Zerstörung bis 45° bei Gruppe 2, 50° bei Gruppe 3 und 70° bei Gruppe 4 betrug stets weniger als 10%. Die EULER'sche Destruktionstemperatur ergab sich für Gruppe 2 zwischen 49 und 53°, für Gruppe 3 zwischen 67, 5 und 82, 5° mit einer Konzentration der Werte zwischen 75 und 79°C und für Gruppe 4 zwischen 80 und 85°C. Für die Letztere wurden 80° einmal, 81° einmal, 82° viermal, 83° zweimal, 84° fünfmal und 85° einmal gemessen.

Ob dem EULER'schen Begriff beim Bacterium coli eine Bedeutung zuzumessen ist, könnte in Zweifel gestellt werden, da die Inaktivierung zwischen 50 und 0% nicht wie bei Staphylokokken und Proteus innerhalb eines engen Temperaturbereichs sich vollzieht, sondern vor allem in der Gruppe 3 mehrere Celsiusgrade umfaßt. Eine Beziehung zwischen Serotyp und Katalaseverhalten ließ sich nicht feststellen. Hierzu war die Anzahl der Stämme der einzelnen Serogruppen zu klein.

Der Typ 0 78, von dem 31 Stämme untersucht wurden und also am ehesten eine Aussage über eine Beziehung zwischen Serotyp und Katalaseverhalten zuließe, konnte der Gruppe 1 (4 mal), 3 (22 mal) und 4 (5 mal) zugeordnet werden.

Der Typ 0 4 lieferte den Gruppen 1, 2 und 3 zwei Vertreter, der Gruppe 4 einen Vertreter.

Die zwei 0 26 Stämme gehörten zur Gruppe 3 und 4.

Die Stämme des Typs 0 55 (2), 0 114 (4), 0 127 (5) und 0 128 (1) ließen sich nach der gewählten Methode wegen zu geringer Katalaseaktivität nicht untersuchen. Festzustellen, ob der Katalasemangel für diese Typen ein Charakteristikum ist, bedürfte einer Erweiterung der Versuche. Die Katalasenegativität aller vier 0 114 und aller fünf 0 127 Stämme ist auffällig.

Die unter der Bezeichnung 0 ? eingereihten Stämme stehen in Verbindung mit den Gruppen 2 (3 mal), 3 (7 mal) und 4 (6 mal).

Die starke Beachtung, die die Arbeiten von COHN und MIDDLEBROOK mit INH-resistenten und empfindlichen Tuberkelbakterien gefunden haben, und die Beobachtungen GRUMBACH's und STEIBLE's, die eine Umwandlungsmöglichkeit fakultativer in obligate Anaerobier unter Antibioticawirkung herausstellten, welche

nach LANG auf einer Katalaseinaktivierung beruhen konnte, reizten zum Vergleich der Resistenzbilder der Untersuchungsstämme gegen Chemotherapeutica mit dem Katalaseverhalten.

Das Ergebnis dieser Durchleuchtung ließ die Aufstellung einer Beziehung nicht zu. In allen 4 Gruppen fanden sich Stämme, die voll empfindlich, bzw. einfach oder mehrfach resistent waren. Auch erwiesen sich innerhalb einer Gruppe die voll empfindlichen Stämme nicht graduell reaktionsfähiger gegen Wasserstoffsuperoxyd, als die resistenten Typen.

Schwierigkeiten bereitete der Erfassung der Katalaseaktivität die starke Labilität des Ferments gegen eine längere Aufbewahrung.

Da bei Untersuchungen mit Colibakterien Gesunder durch RIEDERER VON PAAR und BÖHM hierüber keine Angaben gemacht wurden, könnte der Gedanke aufkommen, diese Erscheinung als eine Besonderheit pathogener Colibakterien zu werten, obwohl auch hier einige Stämme diese Verhaltensform durchbrechen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde das Katalaseverhalten tier- und menschenpathogener Colibakterien unter thermischen Einflüssen. Hierbei wurden 66 Stämme der Serogruppen 0 4 (7), 0 26 (2), 0 55 (2), 0 78 (31), 0 114 (3), 0 127 (4), 0 128 (1) und 0 ? (16) berücksichtigt.

Zur Untersuchung wurden NaCl-Suspensionen der einzelnen Stämme hergestellt, deren Katalaseverhalten nach 30-minütiger Einwirkung einer bestimmten Temperatur und anschließender Zugabe von H_2O_2 zur 20-minütigen Reaktion durch Titration gegen Kaliumpermanganat bestimmt wurde.

Die Colistämme zeigten eine geringe Katalaseaktivität, deren Verhalten eine Aufgliederung der Stämme in 4 Gruppen ermöglichte.

Die Gruppe 1 umfaßte 16 Stämme, die wegen zu geringer Aktivität nach der gewählten Methode nicht erfaßt werden konnten. Die Gruppe 2 enthält 5 Stämme, deren Katalase zwischen 45° und $60^{\circ}C$ zerstört wird.

Die 31 Stämme aufnehmende 3. Gruppe wird durch eine zum Teil stufenweise sich vollziehende Katalaseinaktivierung zwischen 45 und $90^{\circ}C$ gekennzeichnet.

In die 4. Gruppe gehören 14 Stämme, die zwischen 70 und $90^{\circ}C$ ihre Aktivität verlieren.

Vergleiche zwischen Katalasetätigkeit und Serotyp, bzw. Antibioticaverhalten, ließen keine Zusammenhänge analysieren.

Die Ergebnisse bestätigen die von LANG, BÖHM und RIEDERER VON PAAR bei Colistämmen gesunder Individuen vorgefundenen Verhältnisse. Auffällig war die bisher nicht beschriebene Erscheinung einer starken Katalaselabilität gegen längere Suspensionsaufbewahrung.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, A.: Jb.Kinderhkl. 101. 295 (1923)
Adam, A.: " 116. 8 (1927)
Adam, A.: Dtsch.med.Wschr. 37. 1250 (1953)
Agner, K.: Biochem. J. 32. 1702 (1938)
Anselmi, D.: Zbl.Bakt.Orig. 92. 518 (1924)
Beijerinck, M.W.: Naturwissensch. Rundschau 8. 671 (1893)
Bingold, K.: Klin.Wschr. 20. 928 (1928)
Bingold, K.: " " 38. 1794 (1928)
Bingold, K.: Zbl.Bakt.Orig. 119. 97 (1930)
Bingold, K.: Zschr.klin.Med. 120. 503 (1932)
Bingold, K.: Wien.med.Wschr. 90. 803 (1940)
Bingold, K. u. W. Lang: Zbl.Bakt.Orig. 163. 357 (1955)
Bitter, L. u. M. Gundel: Klin.Wschr. 3. 2141 (1924)
Böhm, E.: Diss. München 1959
Bonnichsen, R.K.: Arch. Bioch. 12. 83 (1947)
Braun, O.H. u. G. Resemann: Klin.Wschr. 30. 853 (1952)
Cecil, R. u. A.G. Ogston: Biochem.J. 43. 205 (1948)
Chance, B.: Acta chem.scand. 1. 293 (1943)
Cohn, M.L., C. Kovitz,
V. Oda u. G. Middlebrook: Amer.Rev.Tuberc. 70. 465 (1954)
" " " 70. 641 (1954)
Dixon, M.: Biol.Rev. 4. 352 (1929)
Escherich, T.: Die Darmbakterien des Sauglings u. ihre Beziehung
zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart 1886
Euler, H.v.: Spez.Chemie d.Enzyme II 3. 1 (1934)
Euler, H.v. u. R. Blix: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 105. 83
(1919)
Fey, H.: Schweiz.Ztschr.Path.u.Bakt. 19. 543 (1956)
Friederiszick, F.K., Polanetzki
u. E. Eris: Med.Klin. 54. 1541 (1959)
Fujita, A. u. T. Kodama: Biochem.Zschr. 232. 20 (1931)
Gottstein, A.: Arch.path.Anat.u. Physiol. hg.v. Virchow 133. 295
(1893)
Grumbach u. Steible: Schweiz.Zschr.Path. u. Bakt. 13. 586 (1950)
Haber, F. u.
R. Willstätter: Berichte d.Dtsch.Chem.Ges. 64. 2844 (1931)
Herbert, D. u. J.Pinsent: Biochem.J. 43. 193 (1948)
Jacobson: Hoppe-Seyler's Zschr.f. physiol.Chemie 16. 340 (1892)
Jorns, A.: Arch.Hyg. 67. 134 (1908)

- Kauffmann, F.: J. Immun. 57. 71 (1947)
- Keilin, D. u.
E. F. Hartree: Proc. R. Soc. London (B) 119. 141 (1936)
" " " 124. 397 (1938)
- Keilin, D. u.
E. F. Hartree: Biochem. J. 39. 148 (1945)
- Kluyver, A. J.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 138. 100 (1924)
- Kuhn, R. u. L. Brann: Berichte d. Dtsch. Chem. Ges. 59. 2370 (1926)
- Lang, W. u. E. Böhm: Biochem. Zschr. 335. 75 (1961)
- Lang, W. u. H. W. Pabst: Klin. Wschr. 29. 774 (1951)
- Linzenmeier, G.: Zbl. Bakt. Orig. 167. 327 (1956)
" " " 177. 435 (1960)
- Linzenmeier, G.: Med. Klin. 55. 1151 (1960)
- Linzenmeier, G.: Dtsch. med. Wschr. 87. 246 (1962)
- Linzenmeier, G.: Med. Klin. 57. 351 (1962)
- Linzenmeier, G., W. Freislederer,
S. Apak u. H. Metz: Münchn. med. Wschr. 103. 1398 (1961)
- Linzenmeier, G. u. H. Metz: Med. Klin. 55. 1151 (1960)
- Loew, O.: U. S. Depart. of Agric. Report 68. Bul. 3 (1901)
- Loew, O.: Zschr. Biol. 43. 256 (1902)
- Loew, O.: Pflüger's Archiv 100. 332 (1903)
- Löwenstein, E.: Wien. klin. Wschr. 16. 1393 (1903)
- Loghem, J. J. van: Zbl. Bakt. Orig. 83. 401 (1919)
- Meyer, K. u. W. Löwenberg: Klin. Wschr. 19. 836 (1924)
- Orla - Jensen, S.: Zbl. Bakt. Orig. 18. 211 (1907)
- Orla - Jensen, S.: Det. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Forhandl. Nr. 5 (1906)
- Ørskov, F.: Acta path. scand. (Kopenh.) 29. 373 (1951)
- Riederer von Paar, R.: Diss. München 1953
- Rywowich, D. u. M. Rywowich: Zbl. Bakt. Orig. 44. 295 (1907)
- Schlunk, F.: Zbl. Bakt. Orig. 92. 116 (1924)
- Schnuchel: Angew. Chem. 67. 654 (1955)
- Schönbein: J. prakt. Chem. 89. 323 (1863)
- Stapp, C.: Zbl. Bakt. Orig. 92. 161 (1924)
- Sumner, J. B. u. N. Gralén: J. biol. chem. 125. 33 (1938)
- Taylor, J.: Zbl. Bakt. Orig. 174. 357 (1959)
- Theorell, H., Sumner, J. u.
K. Myrbäck: "The Enzymes" 404
- Thunberg, T.: Skand. Arch. Physiol. 35. 163 (1917)
" " " 40. 1 (1920)
- Virtanen, A. J.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 134. 300 (1924)
- Virtanen, A. J.: Acta chemica Fennica 6. 14 (1931)

- Virtanen, A.J. u.
H. Karström: Biochem. Zschr. 161. 9 (1925)
- Virtanen, A.J. u.
A.O. Winter: Biochem. Zschr. 197. 210 (1928)
- Wieland, H.: Berichte der Deutschen Chem. Ges.
45. 484, 679, 2606 (1912)
46. 3327 (1913)
47. 2085 (1914)
54. 2353 (1921)
- Zeile, K.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 195. 39 (1931)
- Zeile, K.: Ergebn. d. Enzymforsch. 3. 265 (1934)
- Zeile, K., G. Fawaz u.
V. Ellis: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 263. 181 (1940)
- Zeile, K. u.
H. Hellström: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 192. 171
(1930)

Herrn Oberarzt Priv.-Doz. Dr. W. LANG schulde ich besonderen Dank für die Überlassung des Themas, die Referierung der Arbeit und die vielen wertvollen Ratschläge während der praktischen Untersuchungen und der Niederschrift.

Herrn Prof. Dr. G. LINZENMEIER vom Max von Pettenkofer-Institut der Universität München danke ich aufrichtig für die Auslieferung und serologische Nachuntersuchung des umfangreichen Keimmaterials.

L E B E N S L A U F

Am 16. Mai 1936 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Ferdinand Hilfer und seiner Ehefrau Anna, geb. Salden, in Essen geboren.

Besuch der Volksschule in Essen und Ponitz/Thüringen. Absolvierung des neu-sprachlichen Gymnasiums in Essen-Borbeck mit Reifezeugnis vom 1. März 1957.

Beginn des Studiums der Zahnheilkunde im Wintersemester 1957 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Physikum im Sommer 1960 in München.

Ablegung des Staatsexamens im Winter 1963/64 in München.

Anstellung als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten München am 15.3.1964.

